

COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
DESMIELINIZANTES Y AUTOINMUNES

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona con el campo de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, preferentemente con el de la esclerosis múltiple, así como con el empleo de sustancias antagonistas de los receptores P2X, presentes en oligodendrocitos, para el tratamiento de dichas enfermedades, y con composiciones que contengan dichos antagonistas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central más frecuente. Afecta a un millón y medio de personas en el mundo, y sus síntomas aparecen en general en adultos jóvenes, por lo que sus consecuencias a nivel personal y socioeconómico son muy graves.

20

Se piensa que la susceptibilidad a la EM se debe a factores genéticos y ambientales desconocidos. La prevalencia de la enfermedad se sitúa entre 50 a 100 personas por cada 100.000 habitantes en las regiones de alto riesgo, que se localizan principalmente en las zonas septentrionales del hemisferio norte, en Europa y América. El riesgo a padecer EM aumenta 10-20 veces en parientes de primer grado de enfermos, y la concordancia entre gemelos monocigóticos (idénticos genéticamente) se eleva hasta el 30-35%, mientras que gemelos dicigóticos sólo alcanza el 2-5%. La susceptibilidad genética no está caracterizada. Hasta el momento se tienen evidencias de que puede residir en algún polimorfismo de los genes que codifican antígenos leucocitarios humanos (HLA), glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG) y otros genes de los cromosomas 10 y 15.

25

30

Existe un consenso entre los investigadores de la EM según el cual la enfermedad tiene dos fases una inicial inflamatoria, de naturaleza autoinmune, y otra secundaria neurodegenerativa progresiva. En la primera, las células T activadas atraviesan la barrera hematoencefálica, y una vez dentro del Sistema Nervioso Central liberan

citoquinas proinflamatorias que desencadenan una cascada inmunológica que termina en la destrucción de la mielina y muerte de los oligodendrocitos. El conocimiento con un cierto detalle del proceso autoinmune ha servido para desarrollar agentes de naturaleza inmunomoduladora cuya eficacia terapéutica es muy modesta. Sin embargo, no se ha generado ningún medicamento que retrase o detenga el avance de la fase neurodegenerativa de la enfermedad que cursa con deterioro neurológico progresivo e invalidez, y que se caracteriza por la aparición de lesiones desmielinizantes graves en la sustancia blanca con pérdida masiva de oligodendrocitos, atrofia y daño axonal severo. Hasta ahora se han descrito diversas dianas para la intervención durante la fase inflamatoria de la esclerosis múltiple (Zamvil y Steinman, 2003, Neuron 38, 685-688). Entre ellas se encuentran las que se dirigen a reducir la inflamación del sistema nervioso iniciada por la activación de células T específicas de mielina, que promueven la autoinmunidad en particular contra componentes de la mielina, penetran en el tejido nervioso central y liberan en él citoquinas proinflamatorias como el interferon- γ y el factor de la necrosis tumoral- α . El inmunomodulador interferón- β , aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple remitente-recurrente, previene también las interacciones celulares que llevan a la penetración de las células T activadas a través del endotelio vascular. Otros tratamientos en fase de ensayo clínico están dirigidos a neutralizar la actividad de las citoquinas proinflamatorias y/o a potenciar las antiinflamatorias. Un estudio reciente (Youssef et al., 2002, Nature 420, 78-84) ha puesto de manifiesto que el medicamento atorvastatin empleado en el tratamiento de la hipercolesterolemia, es también un potente inmunomodulador que puede prevenir o revertir la EAE crónica mediante la potenciación de la secreción de citoquinas antiinflamatorias y la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias.

Los receptores purinérgicos son un tipo de receptores de membrana activados por purinas extracelulares como ADP y ATP y que median diversos efectos biológicos como la modulación de la actividad neuronal, la liberación de neurotransmisores, la glucogenolisis, la contractilidad de la pared vascular o ciertos procesos inmunológicos etc. Los receptores purinérgicos se clasifican en dos grandes grupos denominados P1, cuya activación esta mediada por adenosina, y P2 cuyos ligandos endógenos son las purinas ATP y ADP y las pirimidinas UTP y UDP. Los receptores P1 transducen la señal al interior de la célula a través de proteínas G y

de acuerdo con sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas se subdividen en cuatro grupos: A1, A2A, A2B y A3. Por su parte, los P2 se dividen en ionotrópicos (P2X) y metabotrópicos (P2Y) (Barnard y cols., 1997; Ralevic y Burnstock, 1998).

5

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que los receptores purinérgicos además de participar en señales propias de la neurotransmisión, también median efectos sobre las células gliales (Rathbone y cols., 1999). De hecho, la expresión de receptores purinérgicos en el sistema nervioso central no está limitada solamente a neuronas, sino que afecta también a la glía (Dunn y cols., 2001; Franke y cols., 2001a; Stevens y cols., 2002). En particular, la señalización purinérgica en los astrocitos y la microglía sirve como un medio de comunicación glía-glía y glía-neurona (Fields y Stevens, 2000). Además, algunos estudios muy recientes señalan la presencia de receptores funcionales en oligodendrocitos in vitro (Stevens y cols., 2002), que apuntan a una participación relevante en las funciones propias de este tipo celular. En particular, Stevens y cols (2002) muestran que la adenosina liberada desde los axones como consecuencia de la actividad eléctrica, inhibe la proliferación de los precursores oligodendrogiales, estimula su diferenciación y promueve la formación de mielina.

10

15

20

La señalización a través de receptores purinérgicos tiene también importancia en la viabilidad celular en respuesta a procesos patológicos cerebrales (revisado en Abbracchio y Burnstock, 1998). Así, están implicados en la respuesta gliótica al daño nervioso (Franke y cols., 2001b; James y Butt, 2001), y en la respuesta reparadora del sistema nervioso central mediante la producción de factores tróficos en astrocitos (Ciccarelli y cols., 2001). A su vez, la presencia de ectonucleotidasas que degradan el ATP hasta adenosina constituye un elemento neuroprotector en la isquemia (Braun y cols., 1998), mientras que el ATP produce muerte de células gliales (Honda y Kohsaka, 2001).

25

30

El conocimiento sobre la implicación del sistema purinérgico en la esclerosis múltiple es muy escaso. Esa información indica que hay alteraciones en la actividad de la 5'-nucleotidasa, el enzima que degrada ATP hasta adenosina. Dicha actividad está más elevada en monocitos sanguíneos de pacientes de esclerosis múltiple

cultivados durante varios días (Armstrong y cols., 1988). Por su parte, las regiones del sistema nervioso central en las que se producen lesiones propias de la esclerosis múltiple tienen una actividad nucleotidasa más baja (Ansari y cols., 1978), lo que puede producir concentraciones más elevadas de ATP extracelular y mayor activación de los receptores purinérgicos P2.

Lo sorprendente de la presente invención se basa en el descubrimiento por parte de los inventores de que la administración de una determinada cantidad de algún antagonista de receptores P2X, ya sean de amplio espectro o específico como el ATP oxidado (o-ATP a partir de ahora), selectivo de los receptores P2X7, produce una remisión de los síntomas de la enfermedad.

COMPENDIO DE LA INVENCION

El problema a resolver por la presente invención es proporcionar una serie de compuestos para el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, preferentemente de la esclerosis múltiple.

La solución presentada en este documento se basa en la capacidad que poseen los antagonistas de los receptores purinérgicos P2X de frenar el desarrollo de dichas enfermedades tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

La invención se ilustra en el ejemplo en el que se describen los ensayos llevados a cabo por los inventores en los que, por un lado, se pone de manifiesto que los oligodendrocitos en cultivo expresan los receptores P2X en su superficie y, por otro, que la activación de los mismos con ATP produce un aumento del calcio citosólico y, si el estímulo es prolongado, produce finalmente la muerte de las células. Asimismo, se describen los ensayos en los que se demuestra en modelos *in vivo* e *in vitro* de esclerosis múltiple, que el tratamiento con antagonistas de receptores purinérgicos P2X frena el desarrollo de la enfermedad.

Así pues, un aspecto de la invención se refiere al uso de antagonistas de receptores P2X ya sean de amplio espectro o selectivos de un determinado subgrupo de receptores (como por ejemplo el o-ATP como antagonista selectivo de los receptores P2X7) para el tratamiento de la esclerosis múltiple y en un sentido más amplio de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes.

El segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprenda al menos uno de los mencionados antagonistas de los receptores P2X junto con al menos algún excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 muestra las propiedades electrofisiológicas de los receptores P2X en oligodendrocitos en cultivo. La activación de dichos receptores produce una corriente de entrada que se puede potenciar en ausencia de iones divalentes. Las curvas dosis-respuesta del agonista natural endógeno, ATP, y de análogos del mismo, como el BzATP, indican que las propiedades de las respuestas se asemejan a las de los receptores P2X7 recombinantes expresados en sistemas heterólogos.

La figura 2 pone de manifiesto que, tanto el ATP como el BzATP producen un elevado incremento en la concentración de calcio intracelular que se evita en presencia de PPADS, un antagonista P2X y P2Y de amplio espectro, y también eliminando el calcio del medio extracelular. Además, se observa que las respuestas se potencian con propofol y se inhiben con o-ATP, un antagonista selectivo de los receptores P2X7.

La figura 3 demuestra que la aplicación durante 15 minutos de ATP o BzATP causa muerte de los oligodendrocitos en cultivo. La muerte es dependiente de calcio, pues su eliminación del medio de cultivo hace que no se produzca. El antagonista de amplio espectro PPADS es capaz de prevenirla si se coaplica a la vez que los agonistas.

La figura 4 demuestra que la muerte oligodendroglial por ATP se puede prevenir mediante el antagonista selectivo de los P2X7, el o-ATP.

La figura 5 muestra la expresión in situ de receptores P2X en oligodendrocitos del nervio óptico mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos. Se observa que los receptores P2X2, P2X4 y P2X7 (verde) son muy abundantes en oligodendrocitos (rojo) de nervio óptico. El color amarillo indica el solapamiento de ambos colores, por lo que los mencionados receptores se expresan abundantemente en oligodendrocitos. Del mismo modo, queda claro que estos no se expresan demasiado en astrocitos.

La figura 6 muestra como la infusión lenta de (1 μ l/hora) de BzATP (100 mM) produce lesiones en el nervio óptico, en las que se aprecia daño tisular con astrogliosis y microgliosis, así como desaparición de la mielina en el área dañada y rotura de los axones.

La figura 7 pone de manifiesto que las ratas a las cuales se induce EAE tienen graves síntomas neurológicos que incluyen parálisis de las extremidades e incluso muerte. Sin embargo, el tratamiento previo a la aparición de los síntomas con o-ATP produce la desaparición virtual de los síntomas.

La figura 8 demuestra como, después de doce días tras la inducción de la EAE, la administración de o-ATP hace desaparecer los síntomas neurológicos causados por la enfermedad.

La figura 9 pone de manifiesto que en la EAE los niveles de receptores P2X2 no se alteran significativamente, sin embargo, los de P2X7 bajan de forma drástica. Esto indica que hay una pérdida de células que lo expresan, principalmente oligodendrocitos.

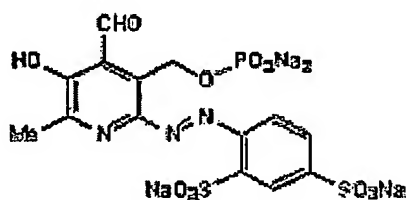
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El primer aspecto de la invención se refiere al uso de los antagonistas de los receptores purinérgicos P2X para el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes. La autoinmunidad requiere la activación de una cascada precisa de procesos en células del sistema inmune. Una parte de esas células, los macrófagos y los linfocitos, expresa receptores P2X1, P2X2, P2X5 y P2X7, y la activación de este último produce la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de la necrosis tumoral α (TNF- α) e IL-1 β así como apoptosis por mecanismos que todavía no están caracterizados (Burnstock, 2002, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22, 364-373). Sin embargo, las funciones precisas que median los receptores P2Xs en el sistema inmune todavía no están bien caracterizadas. Es esta expresión de receptores P2X en células del sistema inmune la que hace adecuado el uso de los antagonistas de receptores P2X para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes. Una realización preferida de la invención contempla como enfermedad a tratar la esclerosis múltiple.

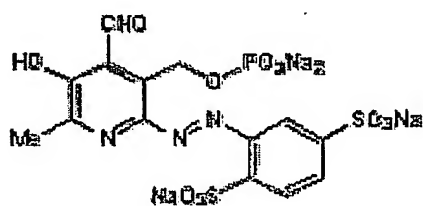
Entre los antagonistas de los receptores P2X existen unos que son llamados de amplio espectro debido a que tienen la capacidad de unirse a varios de los

receptores de la familia P2X, aunque con diferente afinidad a cada uno de ellos; y otros que son selectivos de un determinado grupo de receptores de la familia P2X.

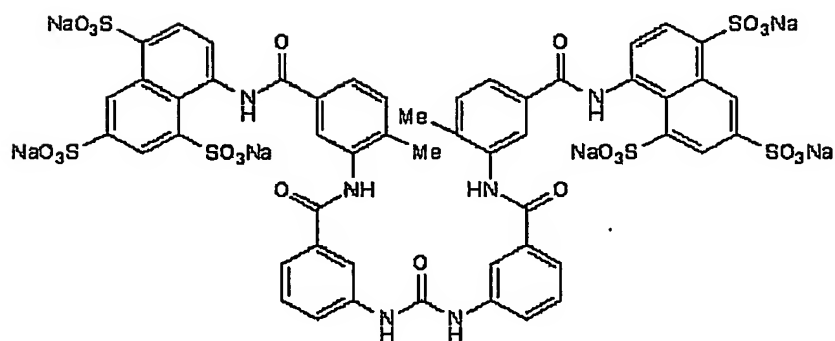
Las siguientes fórmulas representan algunos de estos antagonistas de amplio espectro de los receptores P2X:



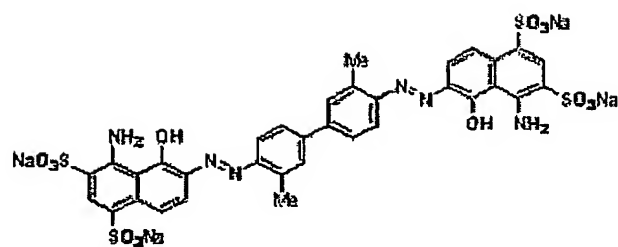
(I)



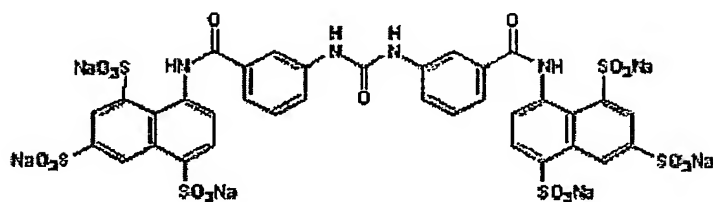
(II)



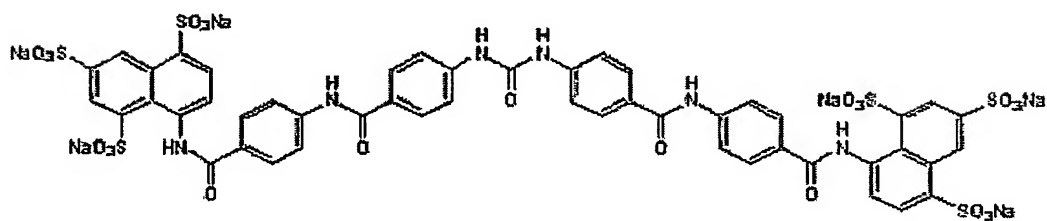
(III)



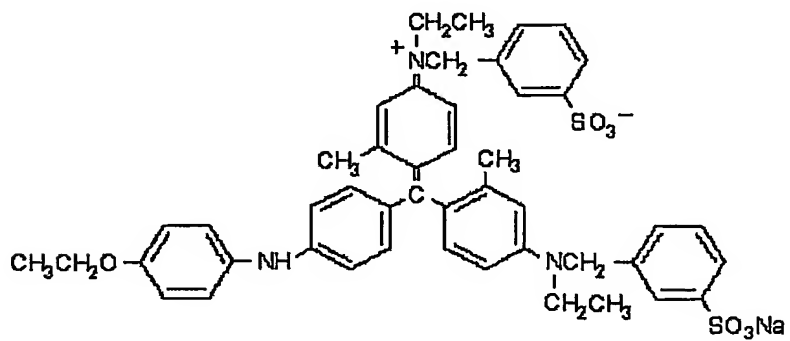
(IV)



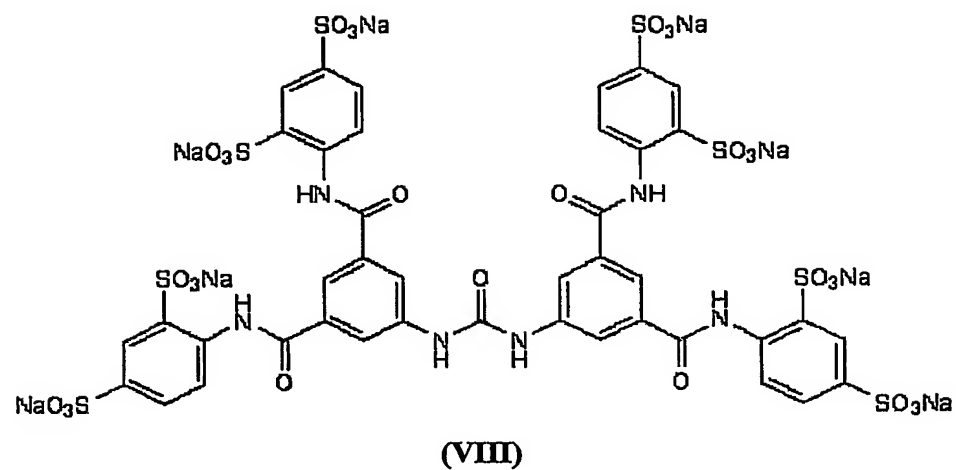
(V)



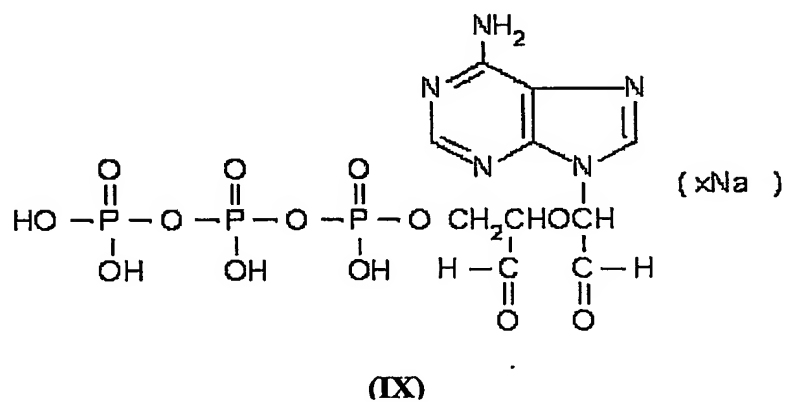
(VI)

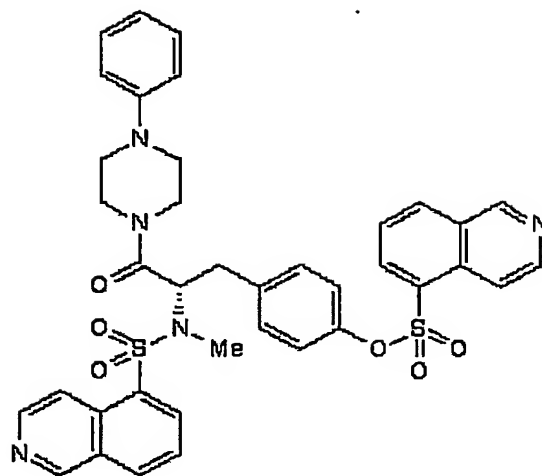


(VII)

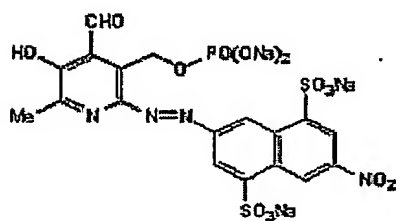


Las siguientes fórmulas representan los antagonistas selectivos de los receptores P2X:

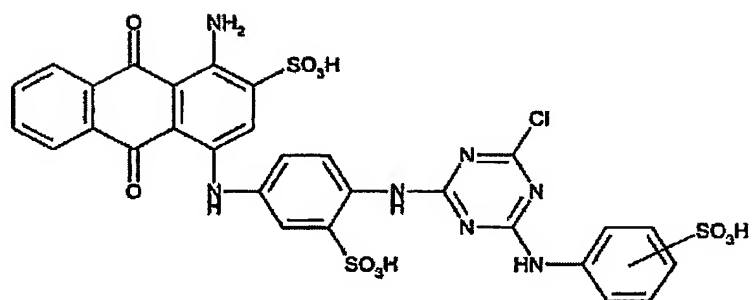




(X)



(XI)



(XII)

Los compuestos anteriormente representados por sus fórmulas estructurales son:

- El PPADS (sal tetrasódica del ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-

disulfónico) (I)

- **El iso-PPADS** (sal tetrasódica del ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-1',4'-disulfónico) (II)
- **El Suramin** (sal hexasódica del ácido 8,8'-[Carbonilbis(imino-3,1-fenilencarbonilimino(4-metil-3,1-fenil)carbonilimino)]bis-1,3,5-naftalentrissulfónico) (III)
- **El Evans Blue** (sal tetrasódica del ácido 6,6'-[(3,3'-Dimetil[1,1'-bifenil]-4,4'-diil)bis(azo)bis[4-amino-5-hidroxi-1,3-naftalendisulfónico]) (IV)
- **El NF023** (sal hexasódica del ácido 8,8'-[carbonilbis(imino-3,1-fenilencarbonilimino)]bis-1,3,5-naftalen-trissulfónico) (V)
- **El NF279** (sal hexasódica del ácido 8,8'-[carbonilbis(imino-4,1-fenilencarbonilimino-4,1-fenilencarbonilimino)]bis-1,3,5-naftalentrissulfónico) (VI)
- **El BBG** (brillant blue coomasie G)(VII)
- **El NF449** (sal octasódica del ácido 4,4',4'',4'''-[Carbonilbis(imino-5,1,3-benzentril-bis(carbonilimino))]tetrakis-1,3-benzendisulfónico) (VIII)
- **El o-ATP** (sal sódica de Adenosina 5-trifosfato, oxidada con periodato) (IX)
- **El KN-62** (éster del ácido 4-[(2S)-2-[(5-isoquinolinilsulfonil)metilamino]-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil)propil] fenil isoquinolinsulfónico) (X)
- **El PPNDS** (sal tetrasódica de piridoxal-5-fosfato-6-(2'-naftilazo-6'-nitro-4',8'-disulfonato) (XI)
- **El RB2** (ácido 1-amino-4-[[4-[[4-cloro-6-[[3 (ó 4)-sulfofenil]amino]-1,3,5-triazin-2-il]amino]-3-sulfofenil]amino]-9,10-dihidro-9,10-dioxo-2-antracensulfónico) (XII)

Además de los anteriormente citados existen otros antagonistas de amplio espectro como son **el MRS2220** (piridoxina- α 4,5-monofosfato-6-fenilazo-2',5'-disulfonato cíclico), **el Ip51** (sal pentapotásica de P¹,P⁵-Diinosina-5-pentafosfato) o **el TNP-ATP** (sal monolitio trisódica de 2',3'-O-2,4,6-trinitrofeniladenosina 5'-trifosfato), así como selectivos como por ejemplo **el HMA** (5-(N,N hexametilen) amilorida).

En la tabla 1 aparecen representados los IC₅₀ de algunos de los compuestos anteriores en relación con los diferentes subgrupos de receptores P2X.

Tabla 1- IC₅₀ de los antagonistas P2X en relación con cada subtipo de receptor P2X

Subtipos P2X	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
Antagonistas: IC ₅₀ (μM)	PPADS: 1-5 Suramin: 1-5 NF023: 0.21 NF279: 0.02	PPADS: 2 Suramin: 1-5 NF 023: 63 NF279: 0.77	PPADS: 1 Suramin: 3 NF 023: 29 NF279: 1.6	PPADS: 27.5 Suramin: 178 NF 023: >100 NF279: >30	PPADS: 2.6 Suramin: 4	PPADS: >100 Suramin: >100	PPADS: 4.2 Suramin: 4
	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400	Evans Blue: 1-400
	isoPPAD S: 1-5		isoPPAD S: 1				
		RB-2: 1					
							HMA: 4,5
							o-ATP: 5
				BBG: >10			BBG: 0,01

Ip5l: 0,003		Ip5l: 3				
MRS2220: 10		MRS2220: 58				
NF449: 0,01		NF449: <0.006				
PPNDS: 0,015						
TNP-ATP: 0.001	TNP-ATP: 1	TNP-ATP: 0,001	TNP-ATP: 15			TNP-ATP: >30

En una realización preferida, uno de dichos antagonistas es un antagonista selectivo de los receptores P2X7, el o-ATP. En los ensayos llevados a cabo por los inventores (ver ejemplo más adelante) este compuesto se ha mostrado especialmente adecuado para tratar la esclerosis múltiple debido a la importancia relativa de la presencia de receptores P2X7 en oligodendrocitos con respecto al resto de receptores P2X.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un antagonista de un receptor purinérgico P2X, ya sea de amplio espectro o selectivo de un subgrupo de receptores, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables serán aquellos excipientes de la técnica que permitan la formulación adecuada de la composición farmacéutica de la invención. Dicha composición puede formularse para su administración oral, intravenosa, tópica, rectal, subdérmica, etc. Es decir, puede presentarse en forma de soluciones, comprimidos, cápsulas, implantes, etc. Asimismo, dicha formulación puede ser de liberación inmediata o de liberación controlada.

Los receptores de amplio espectro pueden ser seleccionados de entre los compuestos anteriormente mencionados. Una realización preferida contempla una composición farmacéutica que contenga como antagonista al menos al o-ATP, selectivo de los receptores P2X7.

En el siguiente ejemplo se detallan los ensayos llevados a cabo por los inventores que ilustran el fundamento de la invención.

EJEMPLO

I- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Cultivos de oligodendrocitos

Los cultivos celulares se realizaron a partir de nervio óptico de rata perinatal (P12)

siguiendo protocolos establecidos, que se adaptaron e introdujeron en el laboratorio según descripción reciente (Matute y cols, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 8830-8835).

Registros electrofisiológicos en oligodendrocitos in vitro

Los registros electrofisiológicos se realizaron en cultivos de 2 a 5 días, y siguiendo las pautas indicadas en trabajos previos (Patneau y cols, 1994, Neuron12: 357-371). Las células se registraron en una cámara que permite variar la composición del medio extracelular a través de un flujo constante (0,5-1 mL/min). Los electrodos de registro fueron capilares de vidrio que contenían soluciones específicas compatibles con las concentraciones iónicas citoplasmáticas. El estudio de las respuestas mediadas por los receptores purinérgicos se realizó mediante la técnica de control de voltaje de la célula entera ("whole-cell patch-clamp"), midiendo las corrientes generadas por la aplicación externa de agonistas y antagonistas selectivos de dichos receptores.

Medición de los niveles de calcio citosólico en cultivos de oligodendrocitos

La concentración de calcio citosólico se determinó mediante el método de Grynkiewicz y cols. (1985; J. Biol. Chem. 260, 3440-3450). Los oligodendrocitos se cargaron con 5 mM de Fura-2/AM, y a continuación se lavaron y se estudiaron en un microscopio invertido Zeiss equipado con un monocromador, objetivo 40x de inmersión, una cámara digital de alta resolución Orca, y un software AquaCosmos (Hamamatsu Photonics). En estas condiciones se ensayaron los cambios en los niveles de calcio citosólico en respuesta a agonistas y antagonistas, en presencia y ausencia de calcio extracelular. La calibración se realizó al final de los ensayos mediante la aplicación sucesiva de ionomicina y EGTA, y la concentración de calcio se estimó mediante la medida del ratio 340/380 nm.

Experimentos en nervio óptico aislado

Los nervios se aislaron de ratas adultas jóvenes, y se perfundieron durante 30 min en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) saturado en oxígeno mediante burbujeo de 95% de oxígeno y 5% de CO₂, en condiciones comparables a las descritas para oligodendrocitos en cultivo (Fern y Möller, 2000, J. Neurosci. 20: 34-42). A continuación se incubaron con agonistas y antagonistas purinérgicos durante diversos tiempos. Posteriormente, los nervios se perfundieron durante 1 a 24 horas con LCRa normal saturado de oxígeno. Transcurrido ese tiempo el daño se evaluó

histológicamente tal y como hemos descrito in vivo (Matute, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10229-10234), y se analizaron los cambios bioquímicos que subyacen a dicho daño.

Métodos inmunoquímicos en cultivos de oligodendrocitos, nervio óptico y en tejido nervioso de animales experimentales

Se emplearon anticuerpos comerciales para el estudio de la presencia de marcadores del linaje oligodendroglial, componentes de la mielina, astrocitos y microglía. Las técnicas incluyeron la inmunocitoquímica, inmunohistoquímica e inmunoblotting (Western blot), todas ellas descritas en detalle (ver por ejemplo, Domercq y cols., 1999, Eur. J. Neurosci. 11, 2226-2236)

Aplicación de sustancias en el nervio óptico in vivo

Los experimentos en nervio óptico se realizaron en conejos (New Zealand White) que, por su tamaño, permiten una mejor manipulación quirúrgica experimental. El procedimiento empleado será el descrito previamente (Matute, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 10229-10234). Los agonistas purinérgicos se aplicaron mediante el empleo de microbombas osmóticas que liberan cantidades pequeñas de soluto durante un tiempo determinado. Posteriormente, se evaluó el efecto de dicha aplicación sobre el nervio con un panel de marcadores de oligodendrocitos y sus progenitores, mielina, integridad axonal, astrogliosis y microgliosis.

Inducción de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE)

Se emplearon ratas Lewis que se inmunizaron subcutáneamente con proteína básica de la mielina inyectada en las patas traseras (100 microgramos/animal en 100 microlitros) y adyuvante de Freund con 5.5 mg/ml de Micobacterium tuberculosis H37Ra. La médula espinal de los animales se extrajo cuando los animales tenían los síntomas de la enfermedad (12-14 post-inmunización) y se analizó la expresión de receptores purinérgicos mediante técnicas inmunoquímicas (inmunoblot e inmunohistoquímica).

II- RESULTADOS

Características de las corrientes mediadas por los receptores P2X en oligodendrocitos

El ATP (1 mM) induce una corriente de entrada que no desensibiliza en la mayoría

de oligodendrocitos examinados ($77,3 \pm 7,9 \%$; $n = 47$; **Fig. 1a**). El análogo del ATP, 2',3'-O-(4-benzoil-4-benzoil) (BzATP, 100 μM), que es un agonista P2X de amplio espectro pero con una afinidad más alta para el receptor P2X7 (Ralevic & Burnstock, 1998), indujo también respuestas similares (**Fig. 1a**). Por el contrario, α, β -metilen-ATP (α, β -Me-ATP, 100 μM), un agonista selectivo de receptores P2X1, P2X3 y heterómeros P2X2/3, no generó corrientes en oligodendrocitos. Se observó que la amplitud de las corrientes generadas por ATP y BzATP depende de la concentración del agonista correspondiente (**Fig. 1a**) ($\text{EC}_{50} = 8,77 \text{ mM}$ y $0,52 \text{ mM}$ respectivamente). Asimismo, se pudo constatar que la ausencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} , que incrementa la concentración de ATP^{4-} , la forma activa de los receptores P2X, potencia 4-10 las respuestas (**Fig. 1 a**).

El antagonista de amplio espectro PPADS (100 μM), por su parte, bloquea completamente las corrientes inducidas por ATP (**Fig. 1**). A su vez, el ATP oxidado (o-ATP), un antagonista preferentemente de los receptores P2X7, bloquea parcialmente las corrientes de ATP. A su vez, el Cu^{2+} (1 mM) que es un inhibidor selectivo de los P2X7 (Virginio et al., 1997), reduce las corrientes de ATP, mientras que el propofol (60 μM), un potenciador de los receptores P2X4, no altera dichas corrientes. Estos resultados indican que los receptores P2X presentes en oligodendrocitos tienen propiedades electrofisiológicas compatibles con un predominio de la subunidad P2X7.

La activación de los receptores P2X eleva los niveles de Ca^{2+} citosólico

Se monitorizó $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras aplicar ATP y BzATP con objeto de caracterizar los efectos de la activación de los receptores P2X en oligodendrocitos. Estas células responden a ATP (10 μM) con un incremento rápido en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico basal ($250 \pm 65 \text{ nM}$) a $1200 \pm 468 \text{ nM}$ (**Fig. 2a**). Estas respuestas son reprimidas en presencia de PPADS (50 μM) y en ausencia de Ca^{2+} en la solución de incubación. Estos resultados indican que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta a consecuencia de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y no por la liberación del mismo desde los depósitos intracelulares.

El Bz-ATP (0,01-1 mM) también activa la entrada de Ca^{2+} en oligodendrocitos de forma dosis dependiente (**Fig. 2b, d**). Este efecto desaparece en ausencia de Ca^{2+} extracelular y se bloquea con PPADS (**Fig. 2b, d**). Estos resultados sugieren que

los receptores P2X que contienen la subunidad P2X7 son los principales medidores de la respuesta a ATP. De acuerdo con esta idea, el antagonista selectivo de P2X7 o-ATP (1 mM) (Fernández et al., 2001), reduce un 63 ± 8 el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Bz-ATP (Fig. 2d, e). Por su parte, el propofol (60 μ M), que potencia las respuestas mediadas por P2X4 (Tomioka et al., 2000), potencia el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por 0.1 and 1 mM ATP en un 60 ± 22 and 77 ± 34 % respectivamente (Fig. 2c, d). Por tanto, los receptores nativos P2X que contienen P2X4 también contribuyen a la entrada de Ca^{2+} inducida por ATP en oligodendrocitos.

La activación de los receptores P2X induce muerte oligodendroglial Ca^{2+} dependiente

A todas las concentraciones de ATP (0,01-1 mM) ensayadas se produjo la muerte de un 15-27% de oligodendrocitos que se inhibe en presencia de 50 μ M PPADS y tras quitar el Ca^{2+} del medio de cultivo (Fig. 3a). De la misma forma el agonista Bz-ATP causó una toxicidad similar al ATP (Fig. 3b). Otros agonistas purinérgicos como el ATP- γ -S, que es un análogo más estable que el ATP, y el α,β -meATP son también tóxicos para los oligodendrocitos, lo que excluye la posibilidad de que los metabolitos del ATP sean los causantes de la toxicidad tras activar receptores distintos a los P2X. En su conjunto, los ensayos de toxicidad muestran que los oligodendrocitos son vulnerables a la activación de los receptores P2X por ATP y sus análogos.

Los oligodendrocitos expresan receptores P2X en oligodendrocitos in vitro e in situ

El análisis de la expresión de receptores P2X mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos en cultivos de oligodendrocitos diferenciados (GalC⁺/MBP⁺) puso de manifiesto que estas células tienen principalmente las subunidades P2X2, P2X4 y P2X7 (ver Tabla 2).

Tabla 2. Expresión de receptores P2X en cultivos de oligodendrocitos.

Subunidad	P2x ₁	P2x ₂	P2x ₃	P2x ₄	P2x ₅	P2x ₆	P2x ₇
Expresión	+/-	++	---	++	+/-	+/-	++

Este perfil de expresión es consistente con las propiedades electrofisiológicas y las

características de la toxicidad observada en estos cultivos. Además, el patrón de subunidades observado in vitro también se corresponde con el observado in situ en nervio óptico (Tabla 3) mediante doble marcado de subunidades y anticuerpos específicos del linaje oligodendroglial y astrogial (Fig.5).

Tabla 3. Distribución de receptores P2X en oligodendrocitos en el nervio óptico de la rata

Subunidad	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
Distribución	—	+++	—	+++	+	—	+++

Estos resultados inmunohistoquímicos se confirmaron mediante Western blot (inmunotransferencia).

El ATP mata oligodendrocitos in situ

Para determinar si el ATP es tóxico, a los oligodendrocitos en una preparación de tejido nervioso sin disociar se perfundieron nervios ópticos enteros aislados de ratas adultas con líquido cefalorraquídeo artificial con ATP (100 μ M) durante 3 h. En estas condiciones se produjo un incremento de > 3 veces del número de células que mostraban condensación del núcleo en comparación con los nervios controles perfundidos sin ATP (**Fig. 5**). Las células dañadas se orientan en el eje longitudinal del nervio y forman parte de hileras de oligodendrocitos interfasciculaes. La estimulación con ATP en presencia de PPADS (10 μ M) previene de la muerte de los oligodendrocitos.

A continuación, se infundieron los agonistas ATP- γ -S y BzATP sobre el nervio óptico in vivo mediante bombas osmóticas que liberan cantidades de soluto muy pequeñas a lo largo de 3 días. El examen histológico de los nervios a 7 días de iniciar la aplicación mostró daño tisular en un área restringida a la proximidad de la canula (**Fig. 6**). Además, dicha zona presentaba una gliosis intensa, falta de mielina y daño axonal (**Fig. 6**). En su conjunto estos resultados indican que la activación de los P2X mata oligodendrocitos in situ y que las lesiones in vivo comparten

propiedades propias de las placas de esclerosis múltiple.

El bloqueo de los P2X mejora los síntomas motores de la EAE aguda y crónica

5 Se investigaron los efectos del antagonista de amplio espectro PPADS y del más selectivo o-ATP en el desencadenamiento y curso de la EAE inducida por inmunización de ratas Lewis con proteína básica de la mielina. Las ratas inmunizadas mostraron signos de déficits motores alrededor de los 10 días postinyección, y alcanzaron un máximo a los 14 días (**Fig. 7**). El tratamiento con PPADS (30 mg/kg, dos veces al día) desde los 7 a los 14 días postinyección no mejoró los síntomas y el curso de la enfermedad. En cambio la aplicación de o-ATP (1 y 5 mg/kg, cada 12 h) durante el mismo periodo atenuó o previno la aparición de los síntomas propios de la EAE (**Fig. 7**).

15 Posteriormente se evaluó la eficacia del o-ATP en mejorar los síntomas de la EAE en un modelo remitente-recurrente-crónico. Para ello, se inmunizaron ratas DA con médula espinal singénica observándose la aparición de déficits neurológicos severos a los 7-9 días postinyección, y que alcanzaban su primer pico entorno a los 11 días. El tratamiento con o-ATP (2,5 mg/kg, cada 12 h) una vez instaurados la intensidad máxima de los síntomas los redujo los síntomas y también eliminó aquellos propios de la fase crónica (**Fig. 8**).

Con objeto de conocer el mecanismo de acción por el que el o-ATP mejora el pronóstico de la EAE, se evaluaron mediante Western blot los niveles del receptor P2X7 sobre el que actúa de forma preferente este fármaco en la médula espinal lumbosacra, la región más afectada en esta enfermedad experimental. Encontramos que los niveles de esta subunidad se reducían a la mitad en los animales sometidos a EAE, y que dichos niveles retornaban a los de los controles en aquellos animales con EAE tratada con o-ATP (**Fig. 9**). Estos resultados indican que el tratamiento con o-ATP protege de la muerte a las células que expresan P2X7, y por ende a los oligodendrocitos que son el principal tipo celular que expresa dicha subunidad en la médula espinal.

III- DISCUSIÓN

Los resultados mostrados anteriormente ponen de manifiesto por primera vez que los oligodendrocitos tienen receptores P2X. Asimismo, se detallan las propiedades electrofisiológicas, farmacológicas y moleculares de estos receptores, así como su elevada permeabilidad a calcio. Esta última propiedad hace que los oligodendrocitos sean vulnerables a los estímulos intensos y/o prolongados mediados por estos receptores, al igual que se ha demostrado con los receptores glutamatérgicos en esta población celular (Matute et al., 2001, Trends Neurosci 24, 224-230). La vulnerabilidad de los oligodendrocitos a las señales mediadas por los receptores P2X es una de las causas del daño en el tejido nervioso que subyace a la enfermedad experimental EAE, un modelo de esclerosis múltiple. Finalmente, el bloqueo de los receptores P2X hasta del desencadenamiento de la enfermedad reduce drásticamente los síntomas neurológicos en la EAE aguda, y mejora la evolución y pronóstico en la EAE crónica una vez instaurada la sintomatología.

La invención aquí descrita constituye una vía para el tratamiento de la esclerosis múltiple, una enfermedad que carece de tratamientos eficaces que ralenticen o frenen su progresión. Las vías de intervención que han resultado en el desarrollo de fármacos en fase de ensayos clínicos o de uso como medicamentos en el tratamiento de la esclerosis múltiple tienen mecanismos de acción que regulan el funcionamiento del sistema inmune. El hecho de que el bloqueo de los P2X prevenga los síntomas de la EAE aguda, un modelo de EM que mimetiza la fase inflamatoria/autoinmune de la enfermedad, indica que estos fármacos pueden ser de hecho potentes agentes inmunomoduladores que eviten la autoinmunidad que desencadena la EM y otras enfermedades. Finalmente, los antagonistas de los receptores P2X al ser agentes protectores de la muerte de los oligodendrocitos, la población celular que sufre mayor daño en la EM, tienen un gran potencial terapéutico en la fase neurodegenerativa de esta enfermedad, fase que se prolonga durante decenios y en la que los pacientes sufren un deterioro progresivo que cursa con trastornos motores y sensitivos que produce invalidez.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio, M.P. and Burnstock, G. (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. Jpn. J. Pharmacol. 78: 113-145.

- **Ansari KA, Rand A, Loch JA** (1978) Biochemical and immunological studies with human optic and olfactory tracts *J Neuropathol Exp Neurol* 37:756-67
- **Armstrong MA, Shah S, Hawkins SA, Bell AL, Roberts SD** (1988) Reduction of monocyte 5'nucleotidase activity by gamma-interferon in multiple *Ann Neurol* 24:12-6
- **Barnard, E.A., Simon, J. and Webb, T.E.** (1997). Nucleotide receptors in the nervous system. An abundant component using diverse signal transduction mechanisms. *Mol. Neurobiol.* 15: 103-129.
- **Braun, N., Zhu, Y., Krieglstein, J., Clumsee, C. and Zimmermann, H.** (1998). Upregulation of the enzyme chain hydrolysing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* 18: 4891-4900.
- **Ciccarelli, R. Ballerini, P., Sabatino, G., Rathbone, M.P., D'Onofrio, M., Caciagli, F. and Iorio, P.** (2001). Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19: 395-414.
- **Dunn, P.M., Zhong, Y. and Burnstock, G.** (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Prog. Neurobiol.* 65:107-134.
- **Fields, R.D. and Stevens, B.** (2000). ATP: an extracellular signalling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci.* 23: 625-633.
- **Franke, H., Grosche, J., Schädlich, H., Krügel, U., Allgaier, C. and Illes, P.** (2001a). P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 108: 421-429.
- **Franke, H., Krügel, U., Schmidt, R., Grosche, J., Reichenback, A. and Illes, P.** (2001b). P2 receptor-types involved in astrogliosis in vivo. *Brit. J. Pharmacol.* 134: 1180-1189.
- **Honda, S. and Kohsaka, S.** (2001). Regulation of microglial cell function by ATP. *Nihon Shinke* 21: 89-93.
- **James, G. and Butt, A.M.** (2001). Changes in P2Y and P2X purinoceptors in reactive glia following axonal degeneration in the rat optic nerve. *Neurosci. Lett.* 212: 33-36.
- **Matute C, Alberdi E, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A and Sánchez-Gómez MV** (2001) The link between excitotoxicity and demyelinating diseases. *Trends Neurosci.* 24, 224-230.
- **Matute C, Alberdi E, Ibarretxe G and Sánchez-Gómez MV** (2002) Excitotoxicity

in glial cells. Eur. J. Pharmacol 447:239-246.

- **Queiroz, G., Gebicke-Haerter, P.J., Schobert, A., Starke, K. and von Kugelgen, I.** (1997). Release of ATP from cultured rat astrocytes elicited by glutamate receptor activation. Neuroscience 78: 1203-1208.

5 - **Ralevic, V. and Burnstock, G.** (1998) Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol. Rev. 50: 413-492.

- **Rathbone, M.P., Meddlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A., Reed, J.K., Ciccarelli, R. Di Iorio, P. and Caciagli, F.** (1999). Trophic effects of purines in neurons and glia. Prog. Neurobiol. 59: 663-690.

10 - **Stevens, B, Porta, S., Haak, L.L., Gallo, V. and Fields, R.D.** (2002) Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. Neuron 36: 855-868.

15 - **Zamvil, S.S. and Steinman L.** (2003) Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. Neuron 38, 685-688.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Antagonista de un receptor purinérgico P2X para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, preferiblemente de la esclerosis múltiple, en mamíferos incluido el hombre.
- 10 2. Antagonista de un receptor purinérgico P2X para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes y autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque el receptor purinérgico es preferentemente un receptor P2X7.
- 15 3. Antagonista de un receptor purinérgico P2X para el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes y autoinmunes de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque el antagonista es un antagonista de amplio espectro para receptores P2X o un antagonista selectivo de un receptor P2X7, como el o-ATP.
- 20 4. Antagonista de un receptor purinérgico P2X para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes y autoinmunes de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque dicho antagonista se puede seleccionar de entre el PPADS, iso-PPADS, Suranim, Evans Blue, NF023, NF279, BBG, NF449, o-ATP, KN62, PPNDS, RB2, MRS2220, Ip51, TNP-ATP o HMA.
- 25 5. Empleo de un antagonista de los receptores purinérgicos P2X en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes y autoinmunes, preferiblemente de la esclerosis múltiple, en mamíferos incluido el hombre.
- 30 6. Empleo de un antagonista de los receptores purinérgicos P2X de acuerdo con la reivindicación 5 caracterizado porque dichos receptores purinérgicos son preferentemente receptores P2X7.

- 5
7. Empleo de un antagonista de los receptores purinérgicos P2X de acuerdo con la reivindicación 5 caracterizado porque dicho antagonista es un antagonista de amplio espectro para receptores P2X o un antagonista selectivo de un receptor P2X7, como el α -ATP.
- 10
8. Empleo de un antagonista de los receptores purinérgicos P2X de acuerdo con la reivindicación 5 a 7 caracterizado porque dicho antagonistas se puede seleccionar de entre el PPADS, iso-PPADS, Suranim, Evans Blue, NF023, NF279, BBG, NF449, α -ATP, KN62, PPNDS, RB2, MRS2220, Ip51, TNP-ATP o HMA.
- 15
9. Composición farmacéutica que comprende al menos un antagonista de un receptor purinérgico P2X y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20
10. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 caracterizada porque el antagonista es un antagonista de amplio espectro para receptores P2X o un antagonista selectivo de un receptor P2X7, como el α -ATP.
11. Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 10 caracterizada porque dicho antagonista se selecciona de entre el PPADS, iso-PPADS, Suranim, Evans Blue, NF023, NF279, BBG, NF449, α -ATP, KN62, PPNDS, RB2, MRS2220, Ip51, TNP-ATP o HMA.

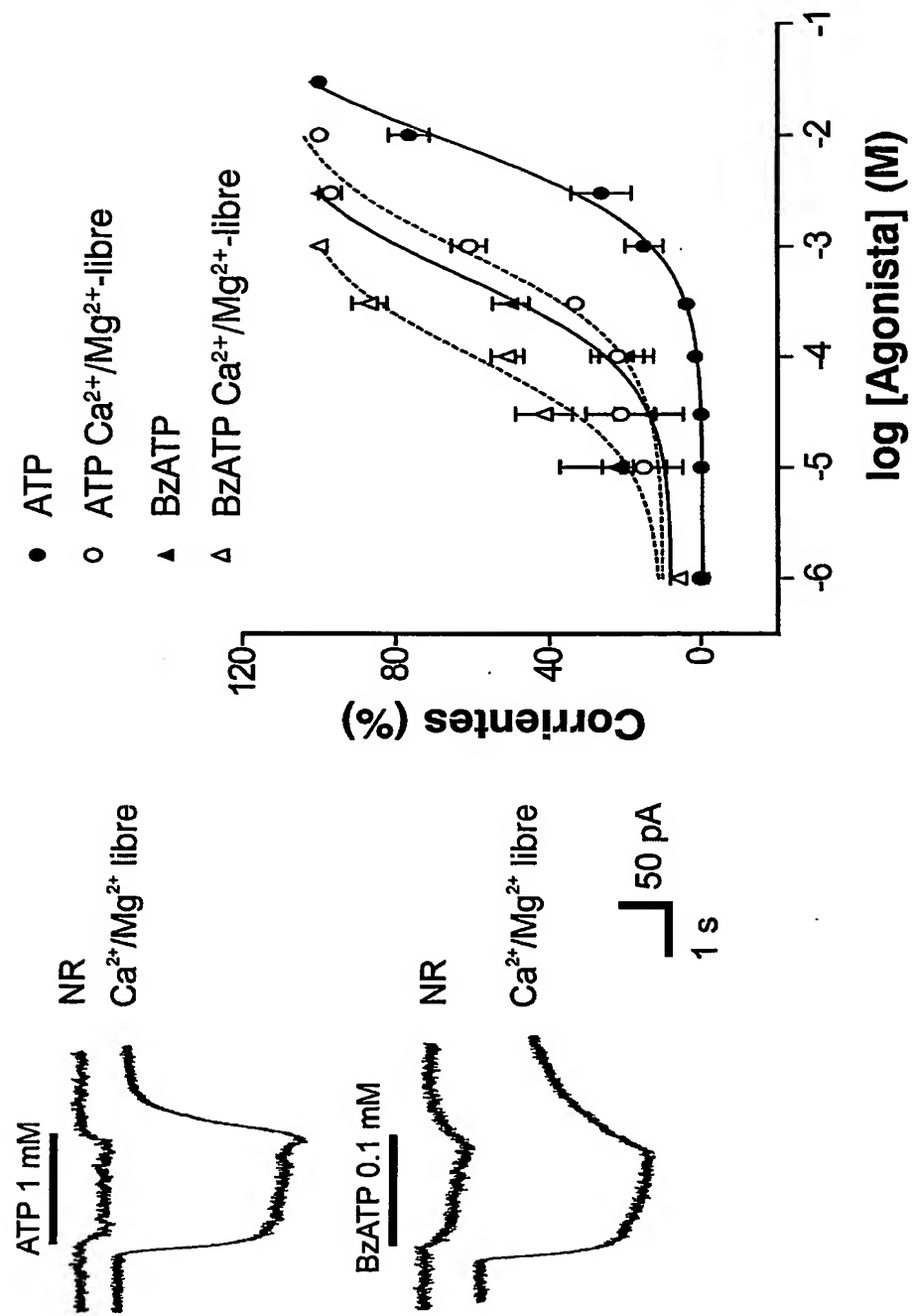


FIG.1

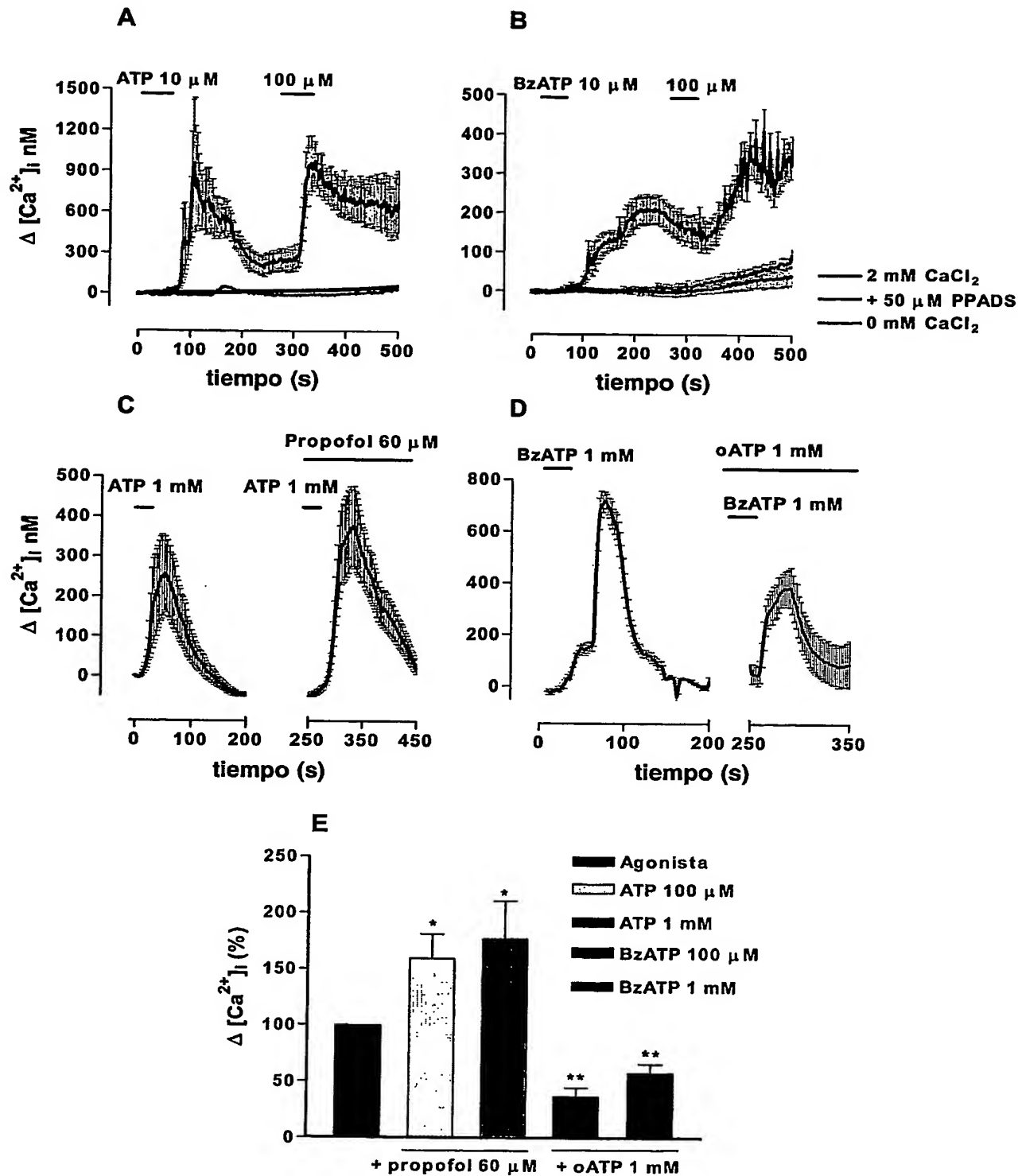


FIG.2

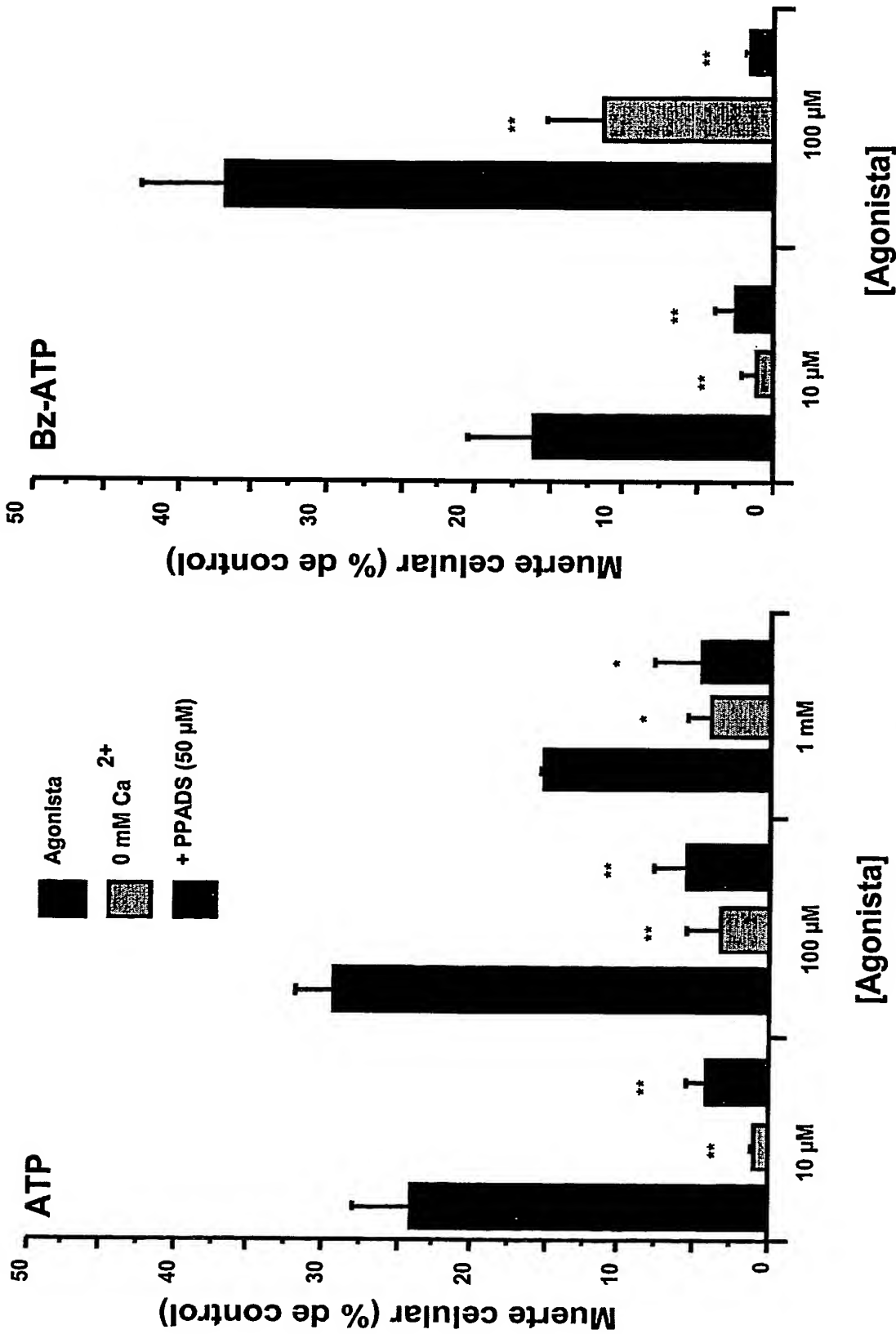


FIG.3

4/9

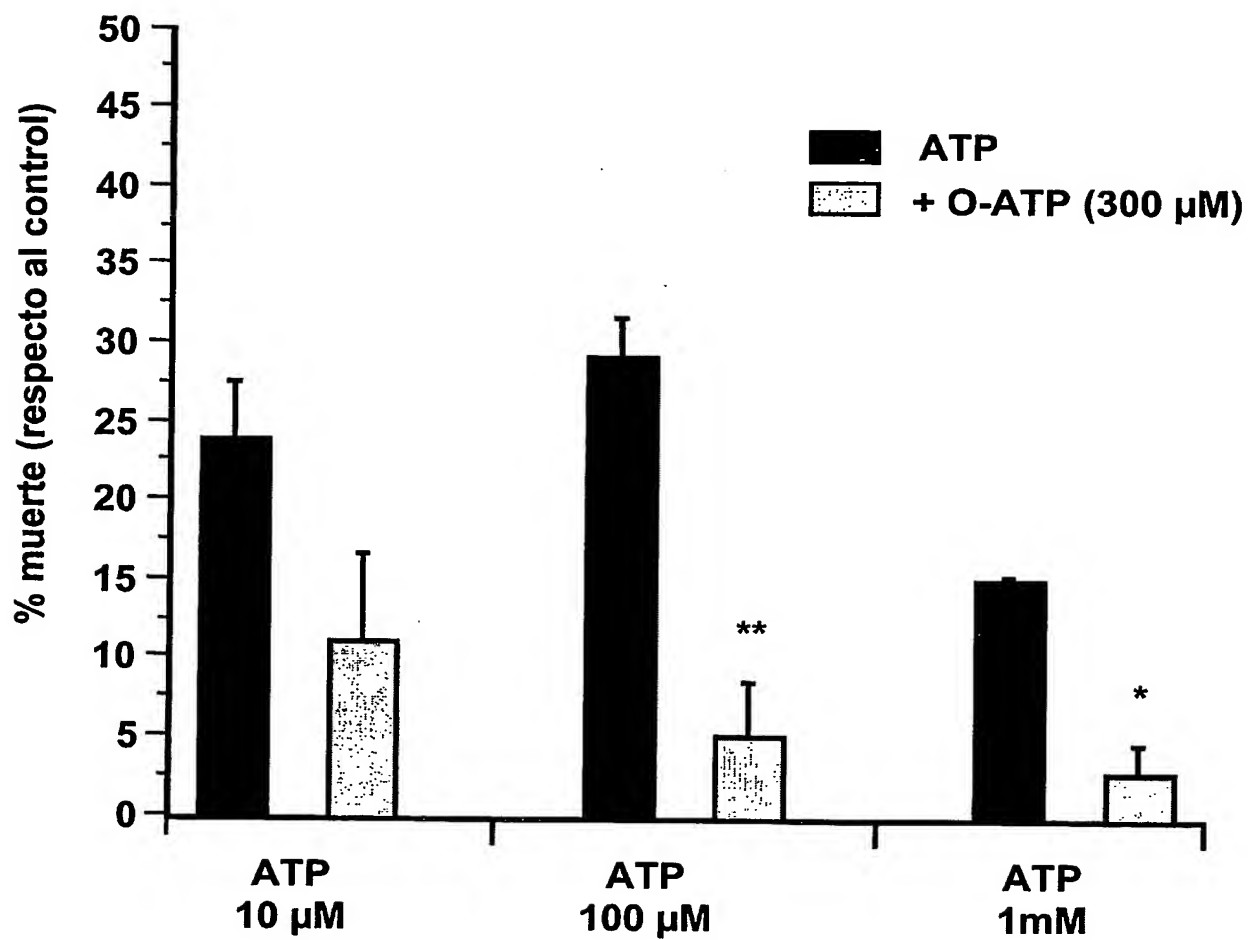


FIG.4

5/9

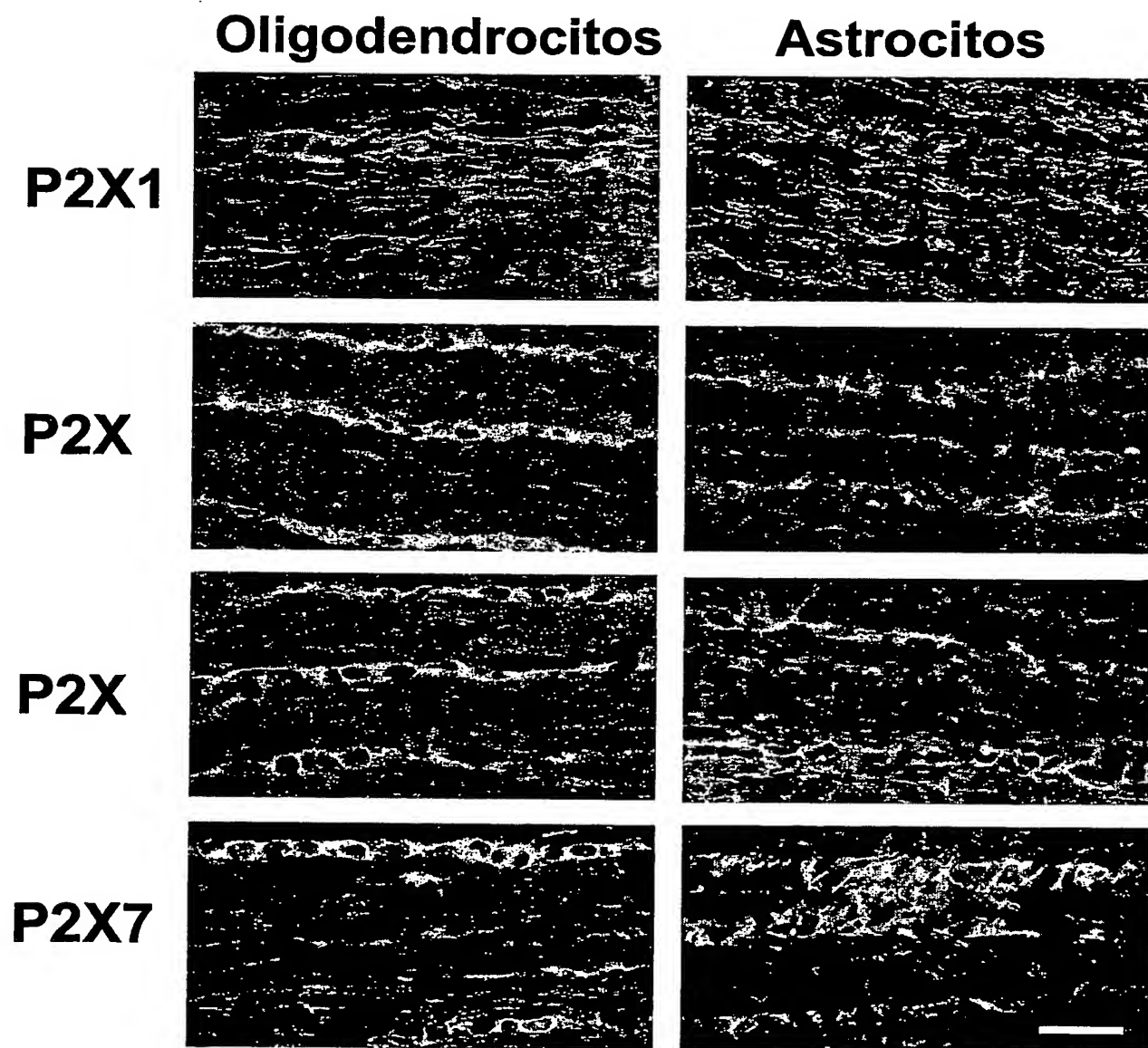
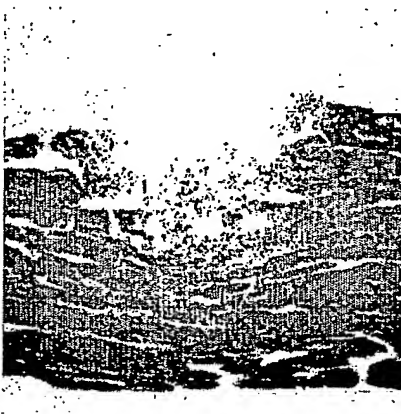


FIG.5

**DAÑO
TISULAR**



**DAÑO
MIELINA**



**DAÑO
AXONES**



FIG.6

7/9

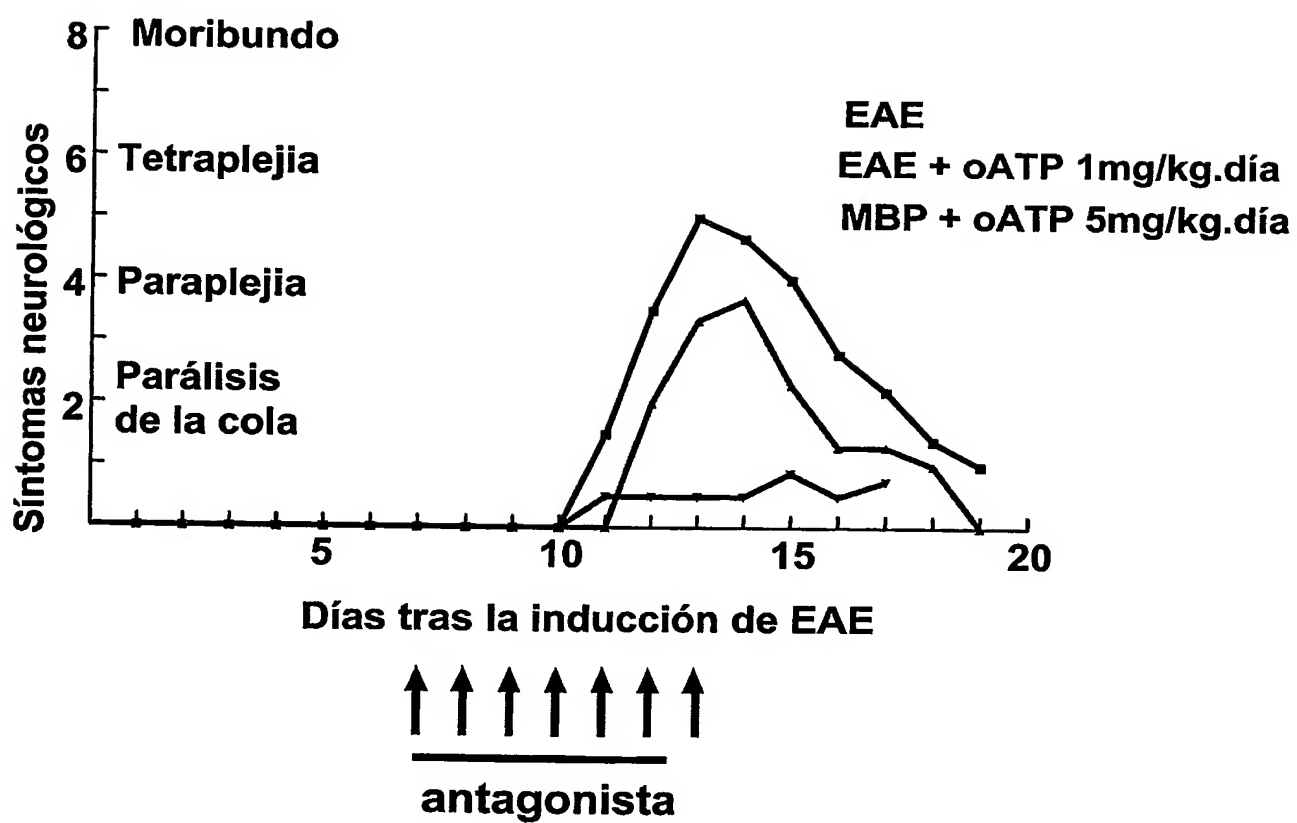


FIG.7

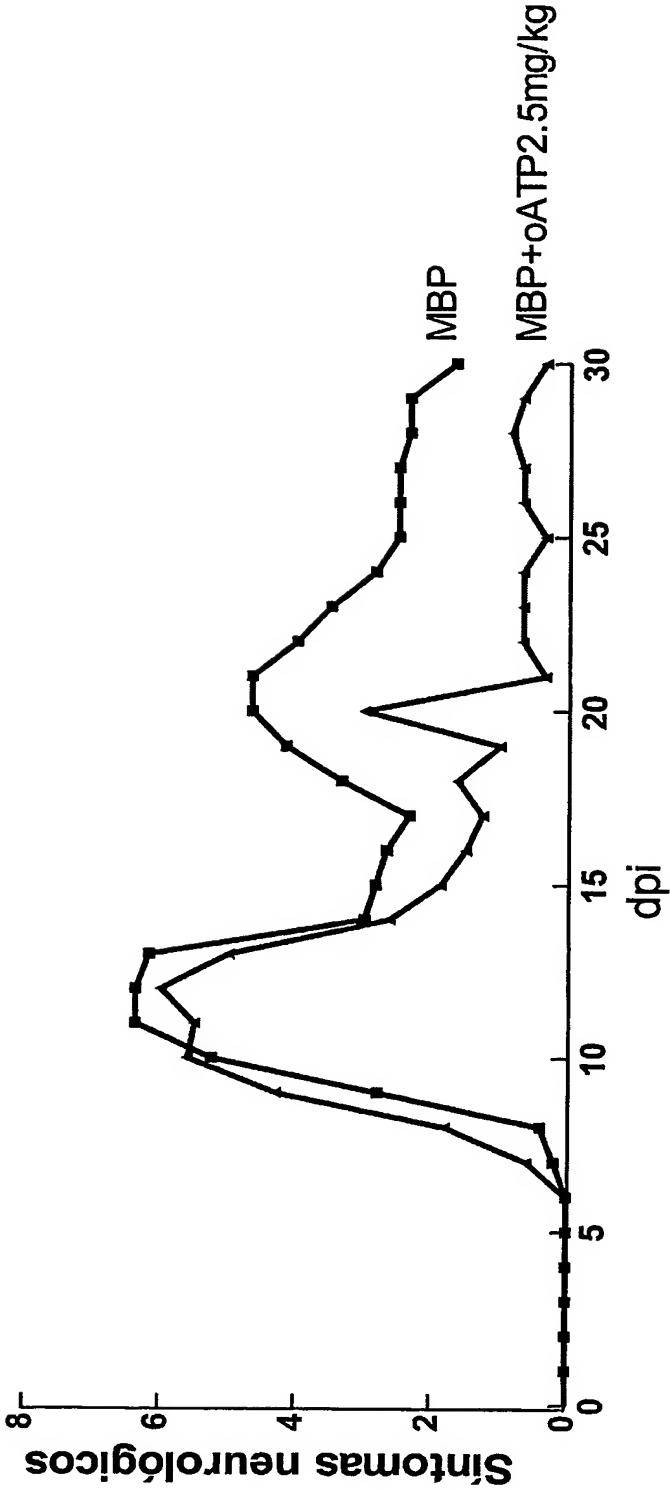


FIG.8

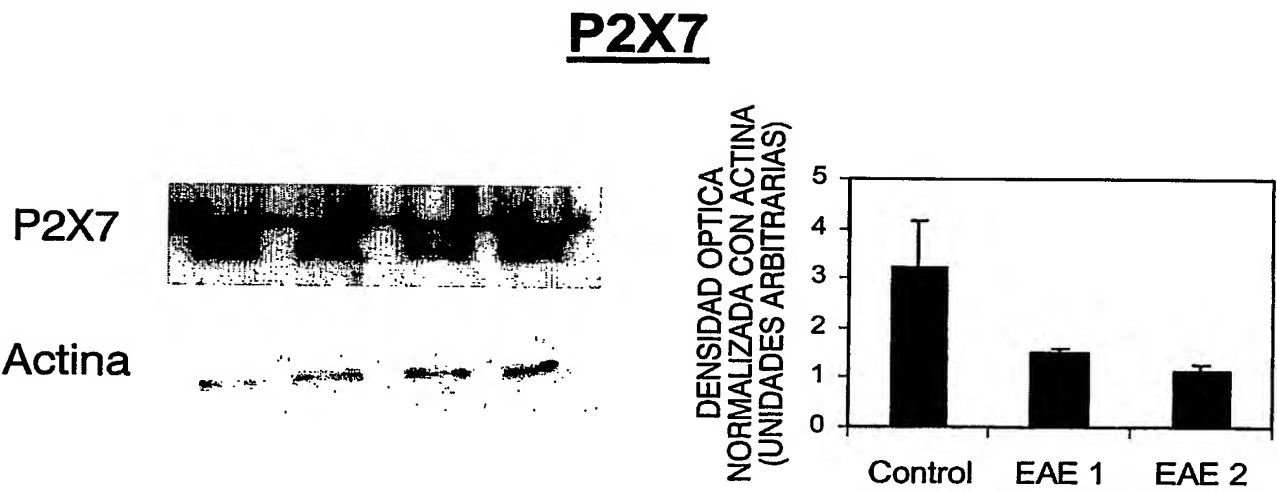
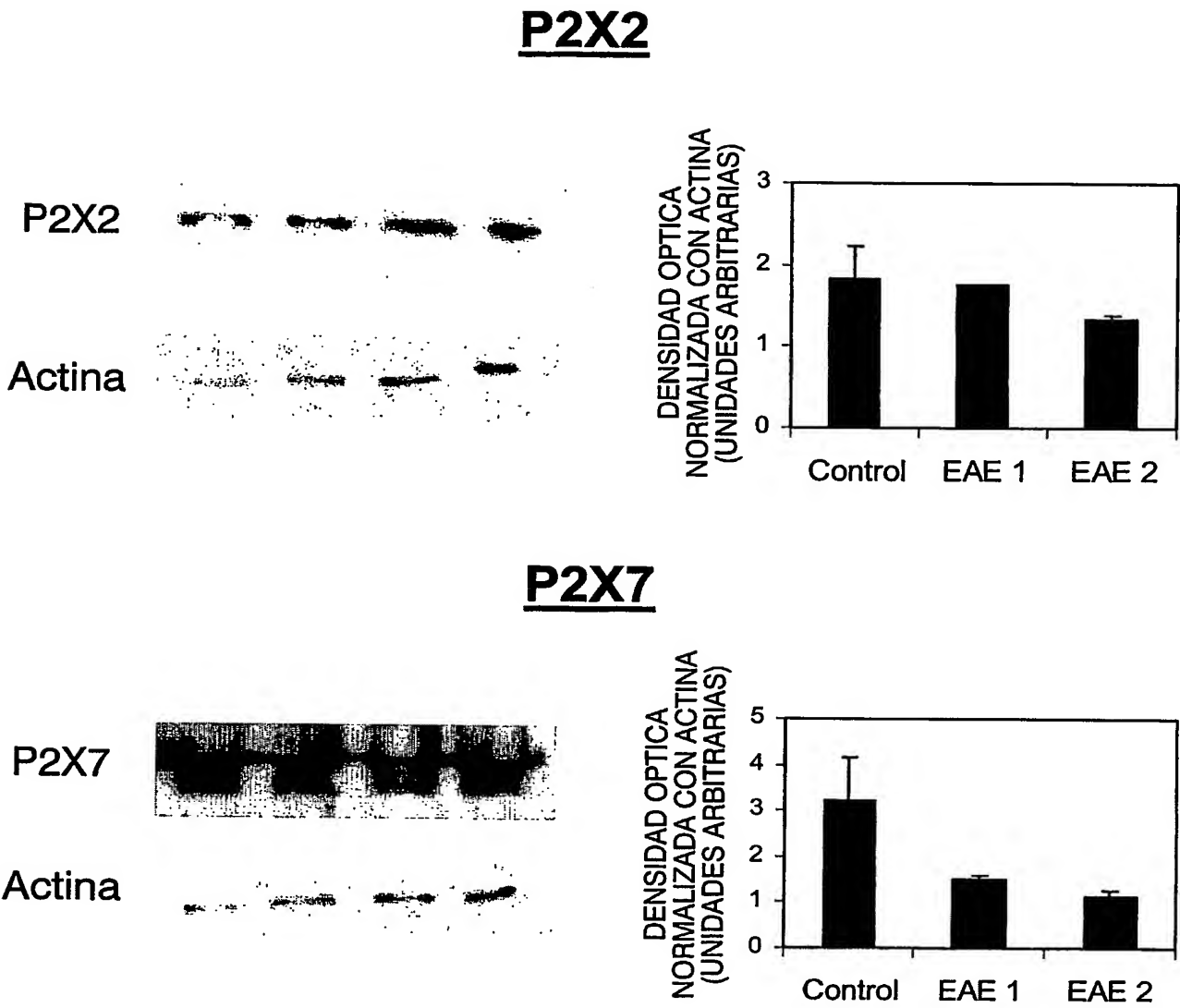


FIG.9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2004/000361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC ⁷ A61K 31/675, 31/185, 31/53, A61P 25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC ⁷ A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9938532A (LINK TECHNOLOGY, INC) 05.08.1999, page 4, lines 10-16, page 14, lines 3-15.	1-4, 9-11.
X	ZIYAL, R. ET AL.: "Vasoconstrictor responses via P2X-receptors are selectively antagonized by NF023 in rabbit isolated aorta and saphenous artery". British Journal of Pharmacology; 1997, vol. 120, pages 954-960, pages 954 and 955, first column, first paragraph.	1-4, 9-11.
X	KIMURA, H. ET AL.: "Suramin-induced reversal of chronic cerebral vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage". J. Neurosurg. 2002, vol. 97, pages 129-135, page 129.	1-4, 9-11.
X	HONORE, P. ET AL.: "TNP-ATP, a potent P2X3 receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics". Pain, 2002, vol. 96, pages 99-105, abstract.	1-4, 9-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 2004 (29.11.2004)

Date of mailing of the international search report

16 December 2004 (16.12.2004)

Name and mailing address of the ISA/

SPTO

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2004/000361

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUKUHARA, N. ET AL.: "Regulation of the development of allodynia by intrathecally administered P2 purinoceptor agonists and antagonists in mice". Neuroscience Letters, 2000, vol. 292, pages 25-28, abstract .	1-4, 9-11.
X	WO 9803178 A (SMITHLINE BEECHAM PLC) 29.01.1998, abstract , page 3, lines 1-18.	1-11
P,X	WO 03103675 A (ENDACEA, INC) 18.12.2003, page 10, lines 26-35, page 15, lines 22-35, claim 3.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ES 2004/000361

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9938532 A	05.08.1999	CA 2318336 A AU 2469599 A US 6117445 A EP 1051192 A EP 19990904255 JP 2002501906 T	05.08.1999 16.08.1999 12.09.2000 15.11.2000 26.01.1999 22.01.2002
WO9803178 A	29.01.1998	NONE	-----
WO03103675 A	18.12.2003	NONE	-----

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2004/000361

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 31/675, 31/185, 31/53, A61P 25/28

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 9938532A (LINK TECHNOLOGY, INC) 05.08.1999, página 4, líneas 10-16, página 14, líneas 3-15.	1-4, 9-11.
X	ZIYAL, R. ET AL.: "Vasoconstrictor responses via P2X-receptors are selectively antagonized by NF023 in rabbit isolated aorta and saphenous artery". British Journal of Pharmacology; 1997, vol. 120, páginas 954-960, páginas 954 y 955, primera columna, primer párrafo.	1-4, 9-11.
X	KIMURA, H. ET AL.: "Suramin-induced reversal of chronic cerebral vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage". J. Neurosurg. 2002, vol. 97, páginas 129-135, página 129.	1-4, 9-11.
X	HONORE, P. ET AL.: "TNP-ATP, a potent P2X3 receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics". Pain, 2002, vol. 96, páginas 99-105, resumen.	1-4, 9-11

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

29 Noviembre 2004 (29.11.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

16 DIC 2004 16.12.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

H. Aylagas Cancio

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 3495475

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2004/000361

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	FUKUHARA, N. ET AL.: "Regulation of the development of allodynia by intrathecally administered P2 purinoceptor agonists and antagonists in mice". Neuroscience Letters, 2000, vol. 292, páginas 25-28, resumen.	1-4, 9-11.
X	WO 9803178 A (SMITHLINE BEECHAM PLC) 29.01.1998, resumen, página 3, líneas 1-18.	1-11
P,X	WO 03103675 A (ENDACEA, INC) 18.12.2003, página 10, líneas 26-35, página 15, líneas 22-35, reivindicación 3.	1-11

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000361

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9938532 A	05.08.1999	CA 2318336 A AU 2469599 A US 6117445 A EP 1051192 A EP 19990904255 JP 2002501906 T	05.08.1999 16.08.1999 12.09.2000 15.11.2000 26.01.1999 22.01.2002
WO9803178 A	29.01.1998	NINGUNO	-----
WO03103675 A	18.12.2003	NINGUNO	-----